

**CARRERA DEL INVESTIGADOR CIENTÍFICO Y  
TECNOLÓGICO**  
**Informe Científico<sup>1</sup>**

**PERIODO <sup>2</sup>: 2012**

Legajo N°:

**1. DATOS PERSONALES**

*APELLIDO: ISLA LARRAIN*

*NOMBRES: MARINA TERESITA*

*Dirección Particular: Calle: N°:*

*Localidad: TOLOSA CP: 1900 Tel:*

*Dirección electrónica (donde desea recibir información): marinaislalarrain@hotmail.com*

**2. TEMA DE INVESTIGACION**

*BIOMARCADORES ASOCIADOS A MECANISMOS TOLEROGÉNICOS EN CÁNCER DE MAMA*

**3. DATOS RELATIVOS A INGRESO Y PROMOCIONES EN LA CARRERA**

*INGRESO: Categoría: ASISTENTE Fecha: 2/1/2007*

*ACTUAL: Categoría: ASISTENTE desde fecha: 2/1/2007*

**4. INSTITUCION DONDE DESARROLLA LA TAREA**

*Universidad y/o Centro: CENTRO DE INVESTIGACIONES INMUNOLÓGICAS  
BÁSICAS Y APLICADAS (CINIBA), UNLP*

*Facultad: FAC. DE CS. MÉDICAS. UNLP*

*Departamento:*

*Cátedra:*

*Otros:*

*Dirección: Calle: 60 y 120 N°: ----*

*Localidad: La Plata CP: 1900 Tel: 4236711 int 342*

*Cargo que ocupa:*

**5. DIRECTOR DE TRABAJOS. (En el caso que corresponda)**

*Apellido y Nombres: SEGAL-EIRAS, AMADA*

*Dirección Particular: Calle: 60 y 120 N°: ----*

*Localidad: La Plata CP: 1900 Tel: 4870414*

*Dirección electrónica: segal.eiras@gmail.com*

<sup>1</sup> Art. 11; Inc. "e" ; Ley 9688 (Carrera del Investigador Científico y Tecnológico).

<sup>2</sup> El informe deberá referenciar a años calendarios completos. Ej.: en el año 2008 deberá informar sobre la actividad del período 1°-01-2006 al 31-12-2007, para las presentaciones bianuales.

.....  
Firma del Director (si corresponde)

.....  
Firma del Investigador

**6. EXPOSICION SINTETICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO.**

*Debe exponerse, en no más de una página, la orientación impuesta a los trabajos, técnicas y métodos empleados, principales resultados obtenidos y dificultades encontradas en el plano científico y material. Si corresponde, explicitar la importancia de sus trabajos con relación a los intereses de la Provincia.*

El cáncer de mama es una enfermedad de alta incidencia y mortalidad en nuestra provincia y en nuestro país, a pesar de los avances terapéuticos.

La detección temprana del cáncer de mama es esencial para lograr eficacia en los tratamientos, y sumamente necesario el hallazgo de nuevas estrategias terapéuticas para aquellos subtipos de la enfermedad que no responden a los tratamientos existentes.

Con el fin de contribuir con la prevención, detección precoz de los tumores primarios o de casos de recurrencia y/o metástasis como así también con la búsqueda de nuevas terapias, es necesario seguir ahondando en el conocimiento del comportamiento tumoral y de la respuesta inmune de las pacientes. En este sentido, es necesario profundizar en la búsqueda de nuevos biomarcadores útiles en pacientes con cáncer de mama como así también en mujeres con patologías benignas.

Con este fin, se llevó a cabo un trabajo tendiente al estudio de la respuesta inmune humoral por medio de una adaptación de las técnicas de inmunohistoquímica e inmunocitoquímica. Se enfrentaron sueros de pacientes con líneas celulares de cáncer de mama y con tejidos tumorales de las mismas pacientes. El paso siguiente consistió en realizar un bloqueo de los cortes de tejido de las pacientes o de MCF7 (línea celular de cáncer de mama) con anticuerpo monoclonal anti-MUC1 y silenciamiento con siRNA en el caso de células de línea tumoral. Posteriormente se realizó una incubación con suero diluido de las pacientes para demostrar cualitativamente la presencia de respuesta inmune humoral dirigida hacia una glicofoma de MUC1 asociada a tumor a través de una disminución en la reactividad e intensidad en las muestras tisulares de las pacientes y en células MCF7. La disminución fue observada en sueros de pacientes con cáncer, con patologías benignas y no así en los de mujeres normales (controles) en la inmunohistoquímica modificada. En los tres grupos se observó disminución de reactividad e intensidad en la adaptación de la inmunocitoquímica. Además se realizó inmunoprecipitación de MUC1 sérica y Western blot con anticuerpos dirigidos contra cadenas cortas de carbohidratos (Tn y TF) en los que se observaron bandas de 200kD compatibles con la presencia de dichos epitopes en MUC1. Además se diseñó un ELISA sandwich para detectar la presencia de epitopes carbohidratos Tn y TF en las glicofomas circulantes de MUC1. Estos experimentos sugirieron la presencia de anticuerpos dirigidos hacia glicofomas asociadas a tumor de muestras provenientes de pacientes con patologías malignas, benignas y en un grupo de muestras de mujeres sin patología mamaria.

Se realizaron investigaciones también acerca de la presencia de la región extracelular de MUC1 en el núcleo de células de cáncer de mama, colon y cabeza y cuello, hallándose por diferentes métodos como inmunohistoquímica y Western blot. Estudios previos habían demostrado la presencia en el cáncer de mama de la cola citoplasmática de MUC1 en el núcleo de estas células.

Es necesario también ampliar el conocimiento en otros aspectos de la respuesta inmune tales como la tolerancia inmunológica y los mecanismos de escape de los que se vale el tumor para evadir al sistema inmune del huésped, para lo cual se está llevando a cabo un estudio acerca del rol de la enzima Indolamino-2,3-dioxigenasa (IDO) en el cáncer de mama. Esta enzima interviene en el catabolismo del triptofano y está relacionada con el

incremento de los linfocitos T regulatorios (CD4+CD25+FoxP3+) y la disminución de las células T efectoras activadas, lo que favorece el microambiente en el que se desarrolla el tumor.

En condiciones normales,IDO es expresada por células dendríticas para generar tolerancia inmunológica a autoantígenos, mecanismo comprobado en la interfase materno-fetal. En los tumores, se ha puesto en evidencia la expresión de IDO por las células tumorales, lo cual generaría un sitio tolerógeno para el tumor y constituiría un blanco terapéutico útil. En relación con esta línea de investigaciones se está llevando a cabo el estudio de la liberación de microvesículas o exosomas por parte de la célula tumoral, los que tendrían un potencial rol en la tolerancia inmunológica del huésped hacia el tumor. La caracterización de estos exosomas aislados de muestras séricas de tumor con anticuerpos dirigidos contra antígenos tales como CD63 y CD9 (tetraspaninas que se hallan en la superficie de los exosomas), EpCAM (molécula de adhesión celular epitelial), IDO (Indolamina 2,3-dioxigenasa), entre otros, pondría en evidencia su procedencia tumoral epitelial y su potencial participación en mecanismos de tolerancia inmune para diferenciarlos de aquellos provenientes de otras fuentes tales como linfocitos o células dendríticas asociados a mecanismos fisiológicos.

Por otra parte, se realizó un trabajo sobre una familia conservada y diversa de proteínas denominada romboide. Estas proteasas con formas activas e inactivas intervienen en la vía de señalización mediada por EGFR, degradación mediada por receptores de estrógenos, muerte celular y proliferación. Se realizaron análisis por RT-PCR e inmunohistoquímica. Se halló sobreexpresión de RHBDD2 en cáncer de mama en el estudio sobre un total de 121 muestras. RHBDL2 y PARL se hallaron asociados significativamente a grados de diferenciación histológica medio/bajo. Así también, se halló correlación entre RHBDL2 y PARL y entre RHBDD2 y RHBDF2. Los resultados de la sobreexpresión hallados por inmunohistoquímica para RHBDD2 en cáncer de mama negativos para receptor de estrógeno y progesterona se corroboraron por técnicas de RT-PCR cuantitativa. Se confirmó el hallazgo de este miembro de la familia romboide en los subtipos de cáncer de mama de mayor diseminación.

También se han llevado a cabo tareas de extensión universitaria para la prevención de cáncer de mama por medio de charlas en unidades sanitarias de La Plata y encuestas en mujeres de diferentes barrios de La Plata.

Las principales dificultades halladas en el plano material se deben a la escasez de insumos y equipamiento para realizar las investigaciones debido al elevado costo de los mismos y la poca accesibilidad a subsidios.

## **7. TRABAJOS DE INVESTIGACION REALIZADOS O PUBLICADOS EN ESTE PERIODO.**

**7.1 PUBLICACIONES.** *Debe hacer referencia exclusivamente a aquellas publicaciones en las que haya hecho explícita mención de su calidad de Investigador de la CIC (Ver instructivo para la publicación de trabajos, comunicaciones, tesis, etc.). Toda publicación donde no figure dicha mención no debe ser adjuntada porque no será tomada en consideración. A cada publicación, asignarle un número e indicar el nombre de los autores en el mismo orden que figuran en ella, lugar donde fue publicada, volumen, página y año. A continuación, transcribir el resumen (abstract) tal como aparece en la publicación. La copia en papel de cada publicación se presentará por separado. Para cada publicación, el investigador deberá, además, aclarar el tipo o grado de participación que le cupo en el desarrollo del trabajo y, para aquellas en las que considere que ha hecho una contribución de importancia, deberá escribir una breve justificación.*

**7.2 TRABAJOS EN PRENSA Y/O ACEPTADOS PARA SU PUBLICACIÓN.** *Debe hacer referencia exclusivamente a aquellos trabajos en los que haya hecho explícita*

*mención de su calidad de Investigador de la CIC (Ver instructivo para la publicación de trabajos, comunicaciones, tesis, etc.). Todo trabajo donde no figure dicha mención no debe ser adjuntado porque no será tomado en consideración. A cada trabajo, asignarle un número e indicar el nombre de los autores en el mismo orden en que figurarán en la publicación y el lugar donde será publicado. A continuación, transcribir el resumen (abstract) tal como aparecerá en la publicación. La versión completa de cada trabajo se presentará en papel, por separado, juntamente con la constancia de aceptación. En cada trabajo, el investigador deberá aclarar el tipo o grado de participación que le cupo en el desarrollo del mismo y, para aquellos en los que considere que ha hecho una contribución de importancia, deberá escribir una breve justificación.*

1. Humoral immune response against tumoral Mucin 1 (MUC1) in breast cancer patients

Isla Larrain MT, Colussi AG, Demichelis SO, Barbera LA, Cretón A, Segal-Eiras A, Croce MV.

To elucidate whether IgG humoral immune response to breast cancer cells is directed to aberrant MUC1 associated to breast cancer, an adaptation of immunohistochemistry (IHC) was performed in 45 breast cancer tissue samples, 12 benign disease samples and 31 normal samples, incubated with matched serum samples from the same patients. Each serum was also incubated, by a modified immunocytochemistry (ICC) with MCF7 cells. In both techniques sera was employed instead of primary antibody. In the case of IHC, reactivity with sera diminished after incubation with anti-MUC1 MAb previously to sera addition step, from 93% to 44% in breast cancer and from 100% to 67% in benign disease, but the reactivity of normal samples (36%) did not change. By ICC, reactivity with sera decreased after incubation with anti-MUC1 MAb from 71% to 16% in breast cancer, from 83% to 0% in benign disease, and from 52% to 10% in normal serum samples. Results were confirmed employing siRNA MUC1 transient gene knockdown. By Western blot analysis –after immunoprecipitation (IP) of circulating MUC1– and by ELISA, TF antigen was detected in circulating MUC1 in all breast cancer and benign samples while Tn was detected in 38% of breast cancer and benign samples.

The evidence of IgG autoantibodies against aberrantly glycosylated MUC1 would be protective and may contribute to a better prognosis in some patients. Enhancement of this natural immune response may constitute an alternative therapeutic strategy.

Aceptado en: The International Journal of Biological Markers (ISSN: 1724-6008).

### **7.3 TRABAJOS ENVIADOS Y AUN NO ACEPTADOS PARA SU PUBLICACION.**

*Incluir un resumen de no más de 200 palabras de cada trabajo, indicando el lugar al que han sido enviados. Adjuntar copia de los manuscritos.*

1. Rhomboid family genes expression profiling in breast normal tissue and tumor samples.

Canzoneri R, Lacunza E, Isla Larrain M, Croce MV, Abba MC.

Rhomboid is an evolutionary conserved and functionally diversified group of proteins composed by proteolytically active and inactive members that are involved in the modulation of multiple biological processes such as EGFR signaling pathway, ER-associated degradation, cell death and proliferation. Recently, several human rhomboid genes have been associated to the development of pituitary, chronic myeloid leukemia, colorectal, ovarian and breast cancers. In this study we evaluated the mRNA and protein expression profiles of nine rhomboid genes in a set of cancer cell lines and breast tissue/tumor samples (n=121). Quantitative RT-PCR analysis showed that different rhomboid genes were typically expressed in normal tissues

and breast carcinoma samples. We identify a significant RHBDD2 mRNA overexpression in advanced breast cancer compared with normal tissue samples ( $p < 0.05$ ). In addition, we found that RHBDL2 and PARL mRNA expression was associated with low/intermediate histologic tumor grade ( $p = 0.024$  and  $p = 0.015$ , respectively). Interestingly, correlation analysis in breast tissue/tumor samples showed coexpression between RHBDL2 and PARL ( $r = 0.638$ ;  $p < 0.001$ ), and RHBDD2 and RHBDF2 genes ( $r = 0.496$ ;  $p < 0.004$ ). Immunohistochemistry analysis showed a significant increase of RHBDD2 protein expression in breast cancer samples negatives for estrogen and progesterone receptors compared with samples positives for both receptors ( $p = 0.017$ ). Moreover, protein expression analysis corroborated the quantitative RT-PCR results, indicating that the breast primary tumors belonging to more disseminated disease expressed significantly increased levels of RHBDD2 protein compared with less disseminated tumors ( $p = 0.01$ ).

Enviado a Tumor Biology (ISSN: 1010-4283)

#### **7.4 TRABAJOS TERMINADOS Y AUN NO ENVIADOS PARA SU PUBLICACION.**

*Incluir un resumen de no más de 200 palabras de cada trabajo.*

1. Indoleamine 2,3-dioxygenase detection in tumors and exosomes isolated from breast cancer patients.

Isla Larrain MT, Rabassa ME, Lacunza E, Barbera A, Cretón A, Segal-Eiras A, Croce MV.

Indoleamine-2,3-dioxygenase catalyzes the first step of tryptophan degradation to kynurenine and has been established as a normal mechanism of peripheral tolerance and immunosuppression. Besides, malignant tumors release exosomes related with tumor dissemination. The aim of this study was to determine the expression of IDO in breast cancer and exosomes derived from tumors and to perform an in silico analysis to find genes associated to the expression of this enzyme. Materials: 88 tissue and serum breast samples (66 malignant, 16 benign and 6 normal), and MCF7, ZR75 and T47D breast cancer cell lines. Methods: standard immunohistochemistry (IHC), immunocytochemistry (ICC), RT-PCR and Western blot (WB) with anti- IDO MAb (Millipore). Exosomes isolation from plasma samples was performed employing gel chromatography and ultracentrifugation. By IHC, 51,5% breast cancer samples were positive with a cytoplasmic pattern while 25% benign samples expressed IDO. Normal controls did not react. Significant differences were found between benign and malignant vs. normal samples ( $p < 0,05$ ). By WB, 4/11 exosome fractions showed bands at 42 kD.

Conclusion: The presence of IDO in breast neoplasms, breast cancer cell lines and breast cancer exosomes may be related to tumoral escape from immunosurveillance and might be considered as a therapeutic target.

2. Nuclear localization of MUC1 extracellular domain in breast, head and neck and colon cancer primary tumors

Rabassa ME, Isla Larrain MT, Lacunza E, Cermignani L, Demichelis SO, Abba MC, Segal-Eiras A and Croce MV

MUC1 is a large transmembrane glycoprotein expressed by epithelial cells and overexpressed and underglycosylated in cancer cells. The MUC1 cytoplasmic subunit (MUC1-C) can translocate to the nucleus and regulate gene expression. It is frequently assumed that the MUC1 extracellular subunit does not enter the nucleus.

Objective: To study the expression of MUC1 extracellular subunit in the nucleus of breast, colon and head neck cancer samples. Materials and Methods: A total of 330 primary tumor samples were analyzed: 166 invasive breast carcinoma, 127 head

and neck tumors, and 47 colon adenocarcinoma. Ten normal specimens of each localization were included as controls. An immunohistochemical approach following standard procedures was performed. Nuclear fractions were separated by homogenization and centrifugation in sucrose gradients and thereafter, analysis by SDS-PAGE and immunoblotting was performed. Two monoclonal antibodies were employed: HMFG1 MAb reacts with the variable tandem repeat of MUC1 protein core and CT2 MAb, developed in Armenian hamster, directed against the last 17 amino-acids (SSLSYNTPAVAATSANL) of the cytoplasmic tail of MUC1. Results: by IHC, 38 out of 166 (23%) breast cancer specimens reacted at the nuclear level, 5/127 (4%) head and neck cancer specimens and 2/47 (4,25%) colon cancer samples were also positive. All tumor samples that reacted with HMFG1 MAb were also positive with CT2 MAb. In normal samples, HMFG1 did not react at nuclear level. By immunoblotting with HMFG1 MAb, nuclear fractions obtained from breast and colon cancer showed a typical MUC1 extracellular domain double band at 200kD in 2 out 11 breast cancer samples and 1/5 colon cancer while 3 nuclear samples derived from head and neck tumors did not react. Conclusions: This study demonstrates that MUC1 extracellular domain is expressed at/in the nucleus of breast, colon and head and neck cancer cells.

**7.5 COMUNICACIONES.** *Incluir únicamente un listado y acompañar copia en papel de cada una. (No consignar los trabajos anotados en los subtítulos anteriores).*

1. Indoleamine 2,3-dioxygenase detection involved in tolerogenic mechanism in patients with breast cancer.

Isla Larrain MT, Rabassa ME, Blas Y, Barbera A, Cretón A, Terrier F, Segal-Eiras A, Croce MV.

X Congress of the Latin American Association of Immunology ALAI 2012. Lima, Perú. Libro de Resúmenes 2012.

2. Detección en tumores de mama de la enzima indolamino-2,3-dioxigenasa involucrada en mecanismos de tolerancia inmunológica

Isla Larrain MT, Rabassa ME, Lacunza E, Blas Y, Barbera A, Cretón A, Terrier F, Segal-Eiras A, Croce MV.

Medicina, 72, Supl. II: 128, 2012.

**7.6 INFORMES Y MEMORIAS TECNICAS.** *Incluir un listado y acompañar copia en papel de cada uno o referencia de la labor y del lugar de consulta cuando corresponda.*

**8. TRABAJOS DE DESARROLLO DE TECNOLOGÍAS.**

**8.1 DESARROLLOS TECNOLÓGICOS.** *Describir la naturaleza de la innovación o mejora alcanzada, si se trata de una innovación a nivel regional, nacional o internacional, con qué financiamiento se ha realizado, su utilización potencial o actual por parte de empresas u otras entidades, incidencia en el mercado y niveles de facturación del respectivo producto o servicio y toda otra información conducente a demostrar la relevancia de la tecnología desarrollada.*

**8.2 PATENTES O EQUIVALENTES.** *Indicar los datos del registro, si han sido vendidos o licenciados los derechos y todo otro dato que permita evaluar su relevancia.*

**8.3 PROYECTOS POTENCIALMENTE TRANSFERIBLES, NO CONCLUIDOS Y QUE ESTAN EN DESARROLLO.** *Describir objetivos perseguidos, breve reseña de la labor realizada y grado de avance. Detallar instituciones, empresas y/o organismos solicitantes.*

**8.4 OTRAS ACTIVIDADES TECNOLÓGICAS CUYOS RESULTADOS NO SEAN PUBLICABLES** (*desarrollo de equipamientos, montajes de laboratorios, etc.*).

**8.5** Sugiera nombres (e informe las direcciones) de las personas de la actividad privada y/o pública que conocen su trabajo y que pueden opinar sobre la relevancia y el impacto económico y/o social de la/s tecnología/s desarrollada/s.

**9. SERVICIOS TECNOLÓGICOS.** Indicar qué tipo de servicios ha realizado, el grado de complejidad de los mismos, qué porcentaje aproximado de su tiempo le demandan y los montos de facturación.

**10. PUBLICACIONES Y DESARROLLOS EN:**

**10.1 DOCENCIA**

Confeción de guías de Trabajos Prácticos.

**10.2 DIVULGACIÓN**

**11. DIRECCION DE BECARIOS Y/O INVESTIGADORES.** Indicar nombres de los dirigidos, Instituciones de dependencia, temas de investigación y períodos.

**12. DIRECCION DE TESIS.** Indicar nombres de los dirigidos y temas desarrollados y aclarar si las tesis son de maestría o de doctorado y si están en ejecución o han sido defendidas; en este último caso citar fecha.

**13. PARTICIPACION EN REUNIONES CIENTIFICAS.** Indicar la denominación, lugar y fecha de realización, tipo de participación que le cupo, títulos de los trabajos o comunicaciones presentadas y autores de los mismos.

1. X Congress of the Latin American Association of Immunology ALAI 2012. Lima, Perú. 28 de mayo-2 de junio de 2012.

Disertante.

Indoleamine 2,3-dioxygenase detection involved in tolerogenic mechanism in patients with breast cancer.

Isla Larrain MT, Rabassa ME, Blas Y, Barbera A, Cretón A, Terrier F, Segal-Eiras A, Croce MV.

2. Jornadas de Medicina, UNLP, 2012. Facultad de Ciencias Médicas, UNLP. La Plata, 18 y 19 de octubre de 2012.

Poster coautor.

Estudio de la expresión de los genes de la familia romboide en muestras tisulares y líneas celulares de cáncer de mama.

Canzoneri R, Lacunza E, Isla Larrain M, Segal-Eiras, Croce MV, Abba MC.

3. LVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica y LX Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Inmunología. Mar del Plata, 14-17 de noviembre de 2012.

Poster coautor.

Detección en tumores de mama de la enzima indolamino-2,3-dioxigenasa involucrada en mecanismos de tolerancia inmunológica

Isla Larrain MT, Rabassa ME, Lacunza E, Blas Y, Barbera A, Cretón A, Terrier F, Segal-Eiras A, Croce MV.

4. 2° Simposio Internacional en Cáncer de mama, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, México. Instituto Karolinska, Suecia. Monterrey, México, 26-30 de Junio 2012.

Poster coautor.

Prevención del cáncer de mama: nuestra experiencia en el CINIBA, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP, Argentina.

Croce MV, Segal-Eiras A, Cermignani L Cobos C, Cobos VA, Merino ME, Ricci J, Isla Larrain M, Rabassa ME, Demichelis SO, Abba MC, Lacunza E.

5. 2° Encuentro Nacional de Epidemiología Pediátrica, Sociedad Argentina de Pediatría. CABA, 19 de octubre de 2012.

Poster coautor.

Perfil nutricional y parasitosis en escolares de zona rural de Magdalena, provincia de Buenos Aires.

Molina N; Ciarmela M; Isla Larrain M; Orden B; Apezteguía M; Pezzani B; Minvielle M.

6. III Jornada Platense de Salud Pública, Enfermedades Emergentes y Zoonóticas. I Jornada sobre Cambio Global y Desarrollo Sustentable. La Plata, Junio 2012.

Poster coautor.

Estrategias de control de las parasitosis intestinales en una comunidad rural de la provincia de Buenos Aires.

Pezzani B, Ciarmela L, Apezteguía M, Orden B, Rosa D, Isla Larrain M, Minvielle M.

**14. CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC.** *Señalar características del curso o motivo del viaje, período, instituciones visitadas, etc.*

Curso Pre-Congreso Inmunología. X Congress of the Latin American Association of Immunology ALAI 2012. Lima, Perú. 28 de mayo-2 de junio de 2012.

**15. SUBSIDIOS RECIBIDOS EN EL PERIODO.** *Indicar institución otorgante, fines de los mismos y montos recibidos.*

CIC. Subsidio para Investigador Asistente. \$ 5600

**16. OTRAS FUENTES DE FINANCIAMIENTO.** *Describir la naturaleza de los contratos con empresas y/o organismos públicos.*

**17. DISTINCIONES O PREMIOS OBTENIDOS EN EL PERIODO.**

**18. ACTUACION EN ORGANISMOS DE PLANEAMIENTO, PROMOCION O EJECUCION CIENTIFICA Y TECNOLÓGICA.** *Indicar las principales gestiones realizadas durante el período y porcentaje aproximado de su tiempo que ha utilizado.*

**19. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO.** *Indicar el porcentaje aproximado de su tiempo que le han demandado.*

Jefe de Trabajos Prácticos Dedicación Simple, Cátedra de Biología, Facultad de Cs. Médicas, UNLP, 20% (desde el 1/5/10).

**20. OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TITULOS ANTERIORES.** *Bajo este punto se indicará todo lo que se considere de interés para la evaluación de la tarea cumplida en el período.*

**PARTICIPACIÓN EN PROYECTOS**

1. Título del Proyecto: Marcadores tumorales en cáncer de mama (11/M153).

Institución acreditadora: Programa de Incentivos UNLP

Año de inicio – año de finalización: 2011-2014.

Director: Prof. Dra. María Virginia Croce.

2. Título del Proyecto: Programa de prevención de cáncer de mama (PRECANMA)

Institución acreditadora: CIC

Director: Prof. Dra. María Virginia Croce

3. Proyecto de Extensión Universitaria.

Institución acreditadora: UNLP

Título del Proyecto: PROCOPIN: la comunidad y la universidad en el control de las parasitosis intestinales y el mejoramiento de la nutrición.

Año 2012

Director: Dra. Marta Cecilia Minvielle

4. Proyecto de Extensión Universitaria.

Institución acreditadora: UNLP

Título del Proyecto: PREDIPRE: Prevención y diagnóstico precoz en el cáncer ginecológico.

Año 2012-2013

Directora: Dra. María Virginia Croce

Co-directora: Dra. Amada Segal-Eiras

Coordinadora: Dra. Marina Isla Larrain

**21. TITULO Y PLAN DE TRABAJO A REALIZAR EN EL PROXIMO PERIODO.** *Desarrollar en no más de 3 páginas. Si corresponde, explicité la importancia de sus trabajos con relación a los intereses de la Provincia.*

**TÍTULO: ESTUDIO DE MOLÉCULAS INVOLUCRADAS EN MECANISMOS DE EVASIÓN TUMORAL EN CÁNCER DE MAMA**

El estudio del cáncer de mama reviste gran importancia para nuestra provincia y para nuestro país debido a que esta enfermedad afecta a un número elevado de mujeres. Esta enfermedad constituye la principal causa de muerte por cáncer en la población femenina en Argentina y presenta la segunda tasa de mortalidad en Latinoamérica. Por lo tanto, es necesario todo aporte que contribuya al esclarecimiento de la patogénesis de la enfermedad, desarrollo, evolución, factores que inciden y de la respuesta inmune que se genera en las pacientes, entre otros aspectos. Así también, se deben desarrollar actividades de extensión universitaria con el fin de incentivar a la población femenina respecto de la prevención de esta enfermedad. Estas tareas deben realizarse en diferentes ámbitos como se están desarrollando desde nuestro Centro mediante charlas informativas, difusión, desarrollo y análisis de encuestas y participación en jornadas y/o congresos.

El estudio de la respuesta inmune humoral en cáncer de mama ha sido evaluado a través del estudio de complejos inmunes y anticuerpos libres circulantes dirigidos contra una glicoproteína transmembrana de elevado peso molecular: la Mucina 1 (MUC1). Esta mucina se halla expresada en epitelios normales en la zona apical de la membrana y se encuentra desregulada su expresión hallándose sobreexpresada en toda la membrana y

en una forma hipoglicosilada. Estos autoanticuerpos y complejos inmunes podrían tener un rol como biomarcadores pronósticos más que diagnósticos.

Si bien el estudio de la respuesta inmune humoral constituye un aspecto sumamente importante a tener en cuenta para evaluar la supervivencia de las pacientes y eficacia de los tratamientos en los diversos subtipos de cáncer de mama, también lo es el estudio de los mecanismos de escape tumoral. Con este fin se estudia el rol de la enzima Indoleamino-2,3-dioxigenasa (IDO) en evasión inmune de los tumores y células T regulatorias. IDO es una enzima de 42-45 kD que cataliza el paso limitante de la degradación del triptofano en la vía de la quinureína. Esta enzima fue originalmente descrita en placenta y contribuye a la tolerancia materno-fetal. Ha sido implicada en mecanismos de protección hacia el rechazo de injertos y en tratamiento de desórdenes autoinmunes. Hay evidencias que sugieren que IDO tiene un rol en la supervivencia de los tumores y que restringe la vigilancia inmunológica del hospedador a través del bloqueo de la respuesta inicial a los antígenos tumorales, inhibiendo la capacidad de las células T activadas para ejercer su efecto citotóxico sobre las células tumorales e incrementando la actividad supresora de los linfocitos T regulatorios CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> (Treg) ya que está implicada en su inducción. Los metabolitos del triptofano parecen afectar a las células Natural Killer (NK) tanto en su proliferación como en su función.

Por otra parte, las células tumorales liberan exosomas o microvesículas que han sido también relacionadas con mecanismos de escape tumoral.

Este estudio tiene como fin determinar la expresión de IDO en células tumorales y en exosomas derivados, lo que implicaría la participación de esta enzima en mecanismos tolerogénicos en el sitio del tumor y en las microvesículas circulantes que podrían contribuir con la diseminación del tumor.

Estudios en un modelo de cáncer de mama en ratones sugieren que pequeñas moléculas inhibitoras de IDO cooperan con agentes citotóxicos que permiten la regresión de tumores establecidos refractarios a la terapia con agentes únicos. Hay hallazgos que sugieren que la pérdida de Bin1 promueve el escape tumoral por desregulación de IDO y que los inhibidores de esta enzima podrían mejorar la respuesta a la quimioterapia del cáncer. Otro estudio sugiere que la actividad de IDO, medida mediante los niveles de quinureína en plasma podría ser utilizada como un marcador de la respuesta a la quimioterapia, aunque se necesitan otros estudios para corroborarlo.

En la biología de las células B ha habido avances que han capitalizado antiguos hallazgos y demostraron estas células también liberan una amplia variedad de citoquinas. Así como sucede en las células Th, las células B pueden ser clasificadas en subtipos de acuerdo al tipo de citoquinas que liberan. Un subtipo funcional de células B regulatorias (Breg) CD19<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> contribuyen aparentemente a mantener el fino equilibrio requerido para la tolerancia. La función reguladora de Breg estaría basada en la IL-10 que inhibe las citoquinas proinflamatorias y participa de la diferenciación de las células T reg.

Los tumores de mama inducen tolerancia hacia el tumor por otros mecanismos relacionados con las células NK, dando lugar a una atenuación en la inmunogenicidad y en la creación de un microambiente inmunosupresor multifacético que bloquea la citotoxicidad de las NK y previene el proceso de maduración final. La inhibición de la función de NK es otro mecanismo tanto como el aumento de la infiltración de Treg, la modulación de células dendríticas y la secreción de inhibidores que contribuyen a la progresión del cáncer de mama. El estudio de las células NK y NKT es relevante en el desarrollo del tumor; se ha sugerido que las células NKT circulantes están disminuidas independientemente del tipo y del tamaño del tumor.

El estudio de nuevos biomarcadores en el cáncer de mama tiene valor diagnóstico, pronóstico y predictivo.

Las biomoléculas asociadas a tumor pueden servir como blanco terapéutico para impedir la proliferación de las células tumorales o bien, exacerbar la respuesta inmune dirigida hacia ellos. Cada paciente presenta una diferente respuesta ante los distintos desafíos antigénicos a los que se expone su sistema inmune así como también puede observarse una diferente evolución ante una misma terapia. No sólo es necesario conocer el subtipo de cáncer de mama que presenta cada paciente en función de los receptores que expresa el tumor: receptores de estrógenos (RE), receptores de progesterona (RP), HER-2 neu, CK 5/6, entre otros, sino también diferentes aspectos de la respuesta inmune individual. La inmunidad natural de cada paciente como los mecanismos de tolerancia que participan en la inmunoevasión de los tumores son factores a tener en cuenta al momento de evaluar una nueva estrategia terapéutica, por lo que estos temas son objeto de numerosas investigaciones.

También se proponen estudios *in silico* para correlacionar los genes asociados a IDO y sus posibles funciones.

#### OBJETIVOS GENERALES

- Investigar la expresión de las biomoléculas asociadas al escape de los mecanismos de inmunovigilancia del huésped y de las mucinas presentes en células tumorales con el desarrollo del cáncer de mama a través de un aumento en la proliferación tumoral, inhibición de apoptosis, entre otros .

- Estudiar la asociación de las biomoléculas mencionadas con los diferentes subtipos de cáncer de mama, muestras procedentes de patologías benignas y de mujeres sin patología mamaria. Analizar el posible rol de los parámetros inmunológicos como biomarcadores.

- Caracterizar y analizar la potencial funcionalidad de los exosomas aislados de plasma de mujeres embarazadas y pacientes con cáncer de mama y líneas celulares tumorales, y relacionarlos con su participación en mecanismos de inmunoevasión en relación a procesos tolerogénicos fisiológicos y patológicos.

#### OBJETIVOS PARTICULARES:

- Analizar la expresión de IDO, de mucinas y antígenos carbohidratos asociados. Estudiar la la presencia de ARN mensajero y correlación con la expresión proteica así como estudiar los procesos afectados ante la presencia de estas biomoléculas en el cáncer de mama. Serán analizadas tanto muestras tisulares como líneas celulares por su relación con mecanismos de tolerancia inmunológica, como así también la detección de células T regulatorias (CD4+ CD25+ FoxP3+) en pacientes en diferentes estadios de la enfermedad y, de ser posible, comenzar un seguimiento de su evolución a través del tiempo.

- Analizar las asociación de las biomoléculas mencionadas anteriormente con los receptores de membrana como RE, RP, Her-2 neu, CK 5/6, EGFR, receptores de la familia romboide y su posible interacción.

- Investigar la naturaleza epitelial y funcionalidad de los exosomas aislados de muestras de plasma, de mujeres embarazadas y de pacientes con cáncer de mama o procedentes de cultivo de líneas celulares (MCF7, T47D, MDA231, ZR75) por ultracentrifugación y gradiente de sacarosa. Se estudiará, en las muestras tumorales, la presencia de EpCAM para analizar su procedencia epitelial. También se estudiará la presencia de biomoléculas asociadas a inmunoevasión tales como IDO, HLA-G, mucinas, carbohidratos asociados, para comprender más ampliamente su composición y función de inmunoevasión propuesta y, en el caso de tumores, la posible participación en el desarrollo de metástasis.

#### MATERIALES:

Pacientes: Se estudiarán grupos de pacientes de carcinoma de mama, de patologías benignas y mujeres sin enfermedad a modo de controles (muestras obtenidas de mastectomías cosméticas), previo consentimiento informado de las pacientes seleccionadas de instituciones asistenciales vinculadas con la Facultad de Cs. Médicas de UNLP.

Anticuerpos monoclonales y policlonales dirigidos contra biomoléculas asociadas a carcinoma de mama y patologías benignas: anti-MUC1 (C595, HMFG1, HMFG2, SM3); anti-MUC1-CT; anti-carbohidratos (Lewis x, sialil Lewis x, Lewis y, Tn, TF), anti-IDO, anti-HLA-G, anti-CD63, anti-CD9, anti-Fox P3, anti-RE, anti-RP, anti CK 5/6, anti-RHBDD2.

#### MÉTODOS:

- Fijación en metacarn e inclusión en parafina de las muestras
- Fraccionamiento subcelular
- Cultivo celular
- Inmunohistoquímica
- Inmunocitoquímica
- ELISA
- Inmunoprecipitación
- SDS-PAGE
- Western Blot
- RT-PCR
- Citometría de flujo
- Ultracentrifugación en gradiente de sacarosa
- Cromatografía de exclusión molecular
- Quimioluminiscencia
- Microscopía electrónica
- Aspectos clínicos: edad, localización y tamaño de la lesión, diagnóstico histopatológico, receptores hormonales en el tumor primario, compromiso ganglionar, estadificación TNM-UICC, tipo de cirugía primaria, radioterapia adyuvante, quimioterapia, hormonoterapia. Para el seguimiento se consignará la fecha de recidiva local y/o metástasis, período libre de enfermedad, supervivencia y muerte por cáncer de mama.
- Análisis estadístico: ANOVA, chi cuadrado, PCA, análisis de correlación (SPSS).

#### BIBLIOGRAFÍA:

- Asgeirsson KS, Agrawal A, Allen C, Hitch A, Ellis IO, Chapman C, Cheung KL, Robertson JF. Serum epidermal growth factor receptor and HER2 expression in primary and metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* 2007;9(6):R7.
- Besmer DM, Curry JM, Roy LD, Tinder TL, Sahraei M, Schettini JL, Hwang SI, Lee YY, Gendler SJ, Mukherjee P. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDA) mice lacking Mucin 1 have a profound defect in tumor growth and metastasis. *Cancer Res.* 2011 May 17.
- Bianco NR, Kim SH, Ruffner MA, Robbins PD. Therapeutic effect of exosomes from indoleamine 2,3-dioxygenase-positive dendritic cells in collagen-induced arthritis and delayed-type hypersensitivity disease models. *Arthritis Rheum.* 2009 Feb;60(2):380-9.
- Croce MV, Isla-Larrain MT, Capafons A, Price MR, Segal-Eiras A. Humoral immune response induced by the protein core of MUC1 mucin in pregnant and healthy women. *Breast Cancer Res Treat.* 2001 Sep;69(1):1-11.
- Croce MV, Isla Larrain MT, Demichelis SO, Gori JR, Price MR, Segal-Eiras A. Tissue and serum MUC1 mucin detection in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2003 Oct;81(3):195-207.

-Croce MV, Isla-Larrain M, Tur R, Rabassa ME, Segal-Eiras A. Antigenic differences between metastatic cells in bone marrow and primary tumours and the anti-MUC1 humoral immune response induced in breast cancer patients. *Clin Exp Metastasis*. 2004;21(2):139-47.

-Croce MV, Isla-Larrain M, Rabassa ME, Demichelis S, Colussi AG, Crespo M, Lacunza E, Segal-Eiras A. Lewis x is highly expressed in normal tissues: a comparative immunohistochemical study and literature revision. *Pathol Oncol Res*. 2007;13(2):130-8. Epub 2007 Jul 3. Review.

-Curti A, TrabANELLI S, Salvestrini V, Baccarani M, Lemoli RM. The role of indoleamine 2,3-dioxygenase in the induction of immune tolerance: focus on hematology. *Blood*. 2009 Mar 12;113(11):2394-401. Epub 2008 Nov 20. Review.

-Das Roy L, Pathangey LB, Tinder TL, Schettini JL, Gruber HE, Mukherjee P. Breast-cancer-associated metastasis is significantly increased in a model of autoimmune arthritis. *Breast Cancer Res*. 2009;11(4):R56. 2009.

- Demichelis SO, Alberdi CG, Servi WJ, Isla-Larrain MT, Segal-Eiras A, Croce MV. Comparative immunohistochemical study of MUC1 and carbohydrate antigens in breast benign disease and normal mammary gland. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2010 Jan;18(1):41-50.

-Demichelis SO, Isla Larrain MT, Cermignani L, Alberdi CG, Segal-Eiras A, Croce MV.

Invasive breast cancer in argentine women: association between risk and prognostic factors with antigens of peptidic and carbohydrate nature. *Breast Cancer: Targets and Therapy*, 3:161-173, 2011.

-Finn OJ: Cancer immunology. *N Engl J Med* 2008, 358:2704-2715. Review.

-Gilewski TA, Ragupathi G, Dickler M, Powell S, Bhuta S, Panageas K, Koganty RR, Chin-Eng J, Hudis C, Norton L, Houghton AN, Livingston PO. Immunization of high-risk breast cancer patients with clustered sTn-KLH conjugate plus the immunologic adjuvant QS-21. *Clin Cancer Res*. 2007 May 15;13(10):2977-85.

-Hanisch FG, Ninkovic T. Immunology of O-glycosylated proteins: approaches to the design of a MUC1 glycopeptide-based tumor vaccine. *Curr Protein Pept Sci*. 2006 Aug;7(4):307-15. Review.

-Holtan SG, Creedon DJ, Haluska P, Markovic SN. Cancer and pregnancy: parallels in growth, invasion, and immune modulation and implications for cancer therapeutic agents. *Mayo Clin Proc*. 2009 Nov;84(11):985-1000. Review.

- Isla Larrain M, Demichelis S, Crespo M, Lacunza E, Barbera A, Cretón A, Terrier F, Segal-Eiras A, Croce MV. Breast cancer humoral immune response: involvement of Lewis y through the detection of circulating immune complexes and association with Mucin 1 (MUC1). *J Exp Clin Cancer Res*. 2009 Aug 28;28:121.

-Koga K, Matsumoto K, Akiyoshi T, Kubo M, Yamanaka N, Tasaki A, Nakashima H, Nakamura M, Kuroki S, Tanaka M, Katano M. Purification, characterization and biological significance of tumor-derived exosomes. *Anticancer Res*. 2005 Nov-Dec;25(6A):3703-7.

-Lee SY, Choi HK, Lee KJ, Jung JY, Hur GY, Jung KH, Kim JH, Shin C, Shim JJ, In KH, Kang KH, Yoo SH. The immune tolerance of cancer is mediated by IDO that is inhibited by COX-2 inhibitors through regulatory T cells. *J Immunother*. 2009 Jan;32(1):22-8.

- Mamessier E, Sylvain A, Thibault ML, Houvenaeghel G, Jacquemier J, Castellano R, Gonçalves A, André P, Romagné F, Thibault G, Viens P, Birnbaum D, Bertucci F, Moretta A, Olive D. Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity. *J Clin Invest*. 2011 Sep;121(9):3609-22. doi: 10.1172/JCI45816. Epub 2011 Aug 15.

- Mauri C, Bosma A. *Annu Rev Immunol.* 2012;30:221-41. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-074934. Epub 2012 Jan 3. Review. Immune regulatory function of B cells.
- Pap E, Pállinger E, Pásztói M, Falus A. Highlights of a new type of intercellular communication: microvesicle-based information transfer. *Inflamm Res.* 2009 Jan;58(1):1-8. Review.
- Poh TW, Bradley JM, Mukherjee P, Gendler SJ. Lack of Muc1-regulated beta-catenin stability results in aberrant expansion of CD11b+Gr1+ myeloid-derived suppressor cells from the bone marrow. *Cancer Res.* 2009 Apr 15;69(8):3554-62. Epub 2009 Apr 7.
- Popov A, Schultze JL. IDO-expressing regulatory dendritic cells in cancer and chronic infection. *J Mol Med.* 2008 Feb;86(2):145-60. Epub 2007 Sep 18. Review.
- Redman CW, Sargent IL. Circulating microparticles in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Placenta.* 2008 Mar;29 Suppl A:S73-7. Epub 2008 Jan 14. Review.
- Riteau B, Faure F, Menier C, Viel S, Carosella ED, Amigorena S, Rouas-Freiss N. Exosomes bearing HLA-G are released by melanoma cells. *Hum Immunol.* 2003 Nov;64(11):1064-72.
- Sabapatha A, Gercel-Taylor C, Taylor DD. Specific isolation of placenta-derived exosomes from the circulation of pregnant women and their immunoregulatory consequences. *Am J Reprod Immunol.* 2006 Nov-Dec;56(5-6):345-55.
- Schettini J, Mukherjee P. Physiological role of plasmacytoid dendritic cells and their potential use in cancer immunity. *Clin Dev Immunol.* 2008;2008:106321. Epub 2009 Jan 26. Review.
- Soliman H, Rawal B, Fulp J, Lee JH, Lopez A, Bui MM, Khalil F, Antonia S, Yfantis HG, Lee DH, Dorsey TH, Ambs S. Analysis of indoleamine 2-3 dioxygenase (IDO1) expression in breast cancer tissue by immunohistochemistry. *Cancer Immunol Immunother.* 2013 May;62(5):829-37. doi: 10.1007/s00262-013-1393-y. Epub 2013 Jan 24.
- Staubach S, Razawi H, Hanisch FG. Proteomics of MUC1-containing lipid rafts from plasma membranes and exosomes of human breast carcinoma cells MCF-7. *Proteomics.* 2009 May;9(10):2820-35.
- Taylor DD, Akyol S, Gercel-Taylor C. Pregnancy-associated exosomes and their modulation of T cell signaling. *J Immunol.* 2006 Feb 1;176(3):1534-42.
- Tinder TL, Subramani DB, Basu GD, Bradley JM, Schettini J, Million A, Skaar T, Mukherjee P. MUC1 enhances tumor progression and contributes toward immunosuppression in a mouse model of spontaneous pancreatic adenocarcinoma. *J Immunol.* 2008 Sep 1;181(5):3116-25.
- Toth B, Lok CA, Böing A, Diamant M, van der Post JA, Friese K, Nieuwland R. Microparticles and exosomes: impact on normal and complicated pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 2007 Nov;58(5):389-402. Review
- von Bergwelt-Baildon MS, Popov A, Saric T, Chemnitz J, Classen S, Stoffel MS, Fiore F, Roth U, Beyer M, Debey S, Wickenhauser C, Hanisch FG, Schultze JL. CD25 and indoleamine 2,3-dioxygenase are up-regulated by prostaglandin E2 and expressed by tumor-associated dendritic cells in vivo: additional mechanisms of T-cell inhibition. *Blood.* 2006 Jul 1;108(1):228-37. Epub 2006 Mar 7.
- von Mensdorff-Pouilly S, Petrakou E, Kenemans P, van Uffelen K, Verstraeten AA, Snjdewint FG, van Kamp GJ, Schol DJ, Reis CA, Price MR, Livingston PO, Hilgers J: Reactivity of natural and induced humoral antibodies to MUC1 mucin with MUC1 peptides and n-actylgalactosamine (GalNAc) peptides. *Int J Cancer* 2000, 86:703-712.
- Whiteside TL. Tumour-derived exosomes or microvesicles: another mechanism of tumour escape from the host immune system? *Br J Cancer.* 2005 Jan 31;92(2):209-11.

---

-Wieckowski E, Whiteside TL. Human tumor-derived vs dendritic cell-derived exosomes have distinct biologic roles and molecular profiles. *Immunol Res.* 2006;36(1-3):247-54. Review.

**INFRAESTRUCTURA Y SERVICIOS DISPONIBLES EN RELACIÓN A LOS REQUERIMIENTOS DEL PLAN DE TRABAJO.**

El Centro de Investigaciones Inmunológicas Básicas y Aplicadas (CINIBA) cuenta con la infraestructura necesaria para el desarrollo completo de este proyecto de investigación. Consta de un Laboratorio de Histología, Inmunología e Inmunoquímica, un Laboratorio de Cultivo Celular y Biología Molecular dentro de los cuales se cuenta con equipamiento adecuado para los requerimientos del presente plan de trabajo.

---

**Condiciones de la presentación:**

- A. El Informe Científico deberá presentarse dentro de una carpeta, con la documentación abrochada y en cuyo rótulo figure el Apellido y Nombre del Investigador, la que deberá incluir:
  - a. Una copia en papel A-4 (puntos 1 al 21).
  - b. Las copias de publicaciones y toda otra documentación respaldatoria, en otra carpeta o caja, en cuyo rótulo se consignará el apellido y nombres del investigador y la leyenda "Informe Científico Período .....".
  - c. Informe del Director de tareas (en los casos que corresponda), en sobre cerrado.
- B. Envío por correo electrónico:
  - a. Se deberá remitir por correo electrónico a la siguiente dirección: [ininvest@cic.gba.gov.ar](mailto:ininvest@cic.gba.gov.ar) (puntos 1 al 21), en formato .doc zipeado, configurado para papel A-4 y libre de virus.
  - b. En el mismo correo electrónico referido en el punto a), se deberá incluir como un segundo documento un currículum resumido (no más de dos páginas A4), consignando apellido y nombres, disciplina de investigación, trabajos publicados en el período informado (con las direcciones de Internet de las respectivas revistas) y un resumen del proyecto de investigación en no más de 250 palabras, incluyendo palabras clave.

---

**Nota:** El Investigador que desee ser considerado a los fines de una promoción, deberá solicitarlo en el formulario correspondiente, en los períodos que se establezcan en los cronogramas anuales.